

法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

Riboprinting法によるParamecium属の形態種間の系統解析

著者	鞠子 典子, 月井 雄二, 鞠子 茂, 高橋 三保子
出版者	法政大学多摩研究報告編集委員会
雑誌名	法政大学多摩研究報告
巻	29
ページ	31-41
発行年	2014-05-30
URL	http://hdl.handle.net/10114/9541

Riboprinting 法による *Paramecium* 属の 形態種間の系統解析

鞠子典子¹⁾・月井雄二²⁾・鞠子 茂³⁾・高橋三保子⁴⁾

Phylogenetic analysis by riboprinting method among *Paramecium* morphospecies.

Noriko MARIKO, Yuuji TSUKII, Shigeru MARIKO and Mihoko TAKAHASHI

I はじめに

Paramecium 属は原生生物の繊毛虫類の一グループであり、世界各地の池や小川や溝などの淡水域をはじめ汽水域等に広く生息している。本属は、細胞長約 70 ~ 300 μ m 程で、細胞形態や小核の個数などをもとに、27 種の形態種 (morphospecies) に分類されている (Fokin, 1997)。また、各形態種は複数の接合型グループからなることもあり、生物種概念における交配反応の問題を理解するうえで貴重な研究材料となっている (Sonneborn, 1937)。

鞠子ら (2014) は大核のゲノム DNA の RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) -PCR による分子系統樹を作成した結果、*Paramecium caudatum* の野生株 (Wild-type stock) は 3 種類のグループに大別できることを明らかにした。また、RAPD 系統樹上の接合型の分布は互いに重なり合い、接合型グループと系統は一致しないことから、*P. caudatum* では接合型が収斂進化を起こしている可能性を指摘するとともに、接合型グループはシンジェンと呼べないという Tsukii (1996) の指摘を支持した。さらに、外群として *P. multimicronucleatum*、*P. aurelia* complex 同胞種 4 種、*P. jenningsi* を加えて RAPD 系統樹を構築した結果、形

態種レベルにおいても収斂進化がおきている可能性が指摘された。同時に鞠子ら (2014) は、大核 DNA を鋳型とする RAPD 法では *Paramecium* 属の形態種間の系統関係を真に理解することは困難であるとの見解も述べている。なぜなら、大核ゲノム全体を対象として変異を検出する場合、進化速度の速い非転写領域が含まれる割合が多くなるため、変異の検出感度が高くなりすぎて種間の系統関係が系統樹に正確に反映されない可能性があるからである。今後は進化速度の遅いマーカーを使った分子系統解析によって *Paramecium* 属内の系統関係が評価されることが課題となっている。

本研究では、RAPD 法で得られた形態種間の系統関係を検証するために、進化速度の遅い遺伝子である 18S rDNA の一部 (約 1.5kb) をマーカーに選び、Riboprinting 法 (Clark and Diamond, 1991) による制限酵素断片長多型の調査を行った。以上の結果に基づいて *Paramecium* 属内の形態種の進化について考察した。

II 方法

1. 使用した株および大核 DNA の抽出

本研究では、*Paramecium* に属する 3 種の形態

1) 早稲田大学理工学研究所

2) 法政大学自然科学センター

3) 法政大学社会学部

4) 筑波大学大学院生命環境科学研究科

種、*P. caudatum*、*P. multimicronucleatum*、*P. aurelia* complex (*P. tetraurelia*、*P. pentaurelia*、*P. octoauurelia*、*P. tredecaurelia*)、*P. jenningsi*、*P. bursaria* を対象として分子系統を調べた。*P. caudatum* は 41 タイプの野生株、*P. multimicronucleatum* は 10 タイプの株、*P. aurelia* complex は 4 つの同胞種 (*P. tetraurelia*、*P. pentaurelia*、*P. octoauurelia*、*P. tredecaurelia*)、*P. jenningsi* と *P. bursaria* はそれぞれ 1 タイプの株を含んだ (表 1)。本研究で供試した *P. caudatum* 野生株は、すべて高橋 (2000) が、日本、アメリカ合衆国、カナダ、ウルグアイ東方共和国、ドイツ、オーストラリア、中国において採集したものである。ただし、*P. caudatum* の GT704、GT806、Hoa-1、133-5、*P. multimicronucleatum* の CH313、

N93005、YM8、YM11、YM25、YM26、*P. tetraurelia* の stock 51、*P. pentaurelia* の stock 87、*P. octoauurelia* の stock 137、*P. tredecaurelia* の stock 321 と、*P. jenningsi* の stock 30997 の大核 DNA は法政大学自然科学センターに、保存の株を使用した。

ゾウリムシは全て鞠子 (2014) に準拠して培養し、大核 DNA を抽出した。

2. Riboprinting 法および系統樹の作成

Clark and Diamond (1991) の Riboprinting 法を一部改変して用いた。プライマーは、*P. caudatum* の 18S rDNA の部分配列 (AF217655; GenBank) を基に設計した。Left-Primer には 5'-cgttgtaattctagactaatacatgc-3' (145-172

表 1 本研究で使用した株の名称採集地

Morphospecies	Stock	Location	
<i>P. caudatum</i>	Bez-1	Beijing	China
	Kum-1-4		China
	Hoa-1	Hokkaido	Japan
	GT806	Ibaraki	Japan
	Ugy145	Melo	Uruguay
	Ugy481, Ugy494	Minas	Uruguay
	Ugy545, Ugy632	Montevideo	Uruguay
	UC162	Indiana	USA
	Tan1, Tan2	Tasmania	Australia
	Uv001, Uv005	Vermont	USA
	Kum-1-5		China
	UC031, UC032	Wisconsin	USA
	UC094, UC096	Ontario	Canada
	UC055	Ontario	Canada
	Ghm-1	Wisconsin	Germany
	UC011	Ohio	USA
	UC113	Indiana	USA
	UC131	Indiana	USA
	UC151	Indiana	USA
	UC153	Ontario	USA
	UC061, UC081	Ohio	Canada
	UC122	Vermont	USA
	Uv051		USA
	Jsh-1-2, Xam2		China
	133-5	Vermont	Japan
	Uv013, Uv024, Uv035, Uv064	Vermont	USA
	Uv073, Uv074, Uv083, Uv084		USA
<i>P. multimicronucleatum</i>	N93005		Japan
	YM8, YM11, YM25, YM26		Japan
	CH100, CH313, 110B		USA
	Hawaii B6		
<i>P. aurelia</i> complex	<i>P. tetraurelia</i> 51		USA
	<i>P. pentaurelia</i> 87		USA
	<i>P. octoauurelia</i> 137		
	<i>P. tedecaurelia</i> 321	Guernavaca	Mexico
<i>P. jenningsi</i>	30997		
<i>P. bursaria</i>	Kz-1w		

注) Riboprinting で使用された *P. caudatum* 41 株、*P. multimicronucleatum* 10 株、*P. tetraurelia*、*P. pentaurelia*、*P. octoauurelia*、*P. tedecaurelia*、*P. jenningsi*、*P. bursaria* 各 1 株を示す。

番目) を、Right-Primer には 5' -cttctcctcctctaagtataaggtt-3' (1709-1736 番目) を用い (フナコシ)、Thermal cycler (Zymoreactor, アトー) で増幅を行った。

PCR による増幅の効率が良好となるように反応液の調整を行った。その結果、*P. caudatum*、*P. multimicronucleatum* では、Taq ポリメラーゼ (5unit/ μ l) (宝酒造) を 0.28 μ l、10 \times PCR Buffer (100mM Tris-HCl; pH8.3、500mM KCl、15mM MgCl₂) (宝酒造) を 12 μ l、1.25mM dATP dCTP dGTP dTTP5 μ l ずつ、0.1% Triton X-100 を 1.32 μ l、プライマー (100pmol/ μ l) を各々 0.8 μ l、鋳型大核 DNA を 2ng 加え、さらに DDW を加えて 120 μ l の PCR 反応液を作成した。

P. aurelia complex、*P. jenningsi*、*P. bursaria* では、Taq ポリメラーゼ (5unit/ μ l) (宝酒造) を 0.4 μ l、プライマー (100pmol/ μ l) を各々 2 μ l に改変して増幅を行った。PCR の温度条件は、熱変性温度が 94℃で 1 分、アニーリング温度が 55℃で 2 分、伸長反応温度が 72℃で 3 分とした。これを 30 サイクル行った。反応終了後、PCR 産物をイソプロパノール沈殿させ、70%EtOH で 1 回洗浄した後、50 ~ 65 μ l の DDW に溶解した。さらに、制限酵素 *Alu* I、*Ase* I、*Bgl* I、*Dra* I、*EcoR* I、*Hae* III、*Hha* I、*Hinf* I、*Msp* I、*Nci* I、*Rsa* I、*Sau96* I、*Xho* I (全てニッポンジーン製) を用いて、DNA を断片化した。

制限酵素処理後のサンプルについては、鞠子 (2014) にならってサブマリン・アガロースゲル電気泳動を行い、ゲル染色により検出された DNA バンドを株間で比較し、系統樹を作成した。

III 結果と考察

18S rDNA をマーカーとして Riboprinting 法による制限酵素断片長多型の調査を行ったところ、13 種の制限酵素による断片長多型のバンドパターンは 1 (*Ase*I) ~ 5 (*Hinf*I) であり、制限酵素の種類によって大きく異なった (図 1)。このバンドパターンにナンバリングをして、各制限酵素の DNA パターンを株ごとに示したのが表 2 である。その結果、*P. caudatum* と *P. multimicronucleatum* ではそれぞれの形態種内で 1 割強の株についてバンドパターンの変異が見られた (詳細は後述)。また、*P. aurelia* complex (*P. tetraurelia*、

P. pentaurelia、*P. octoauurelia*、*P. tredecaurelia*) と *P. jenningsi* は同じ制限酵素断片パターンを示した (表 2)。

表 2 のバンドパターンを株間で比較し、DNA 断片の不一致率 (遺伝子間距離) を付録に示す。この結果をもとに描かれた系統樹 (以降、Riboprinting 系統樹と呼ぶ) を図 2 に示す。*Paramecium* 属の 5 形態種は二つのグループに大別できた。一つは *P. caudatum* / *P. multimicronucleatum* グループ、もう一つは *P. aurelia* complex (*P. tetraurelia*、*P. pentaurelia*、*P. octoauurelia*、*P. tredecaurelia*) / *P. jenningsi* / *P. bursaria* グループであった。*P. caudatum* / *P. multimicronucleatum* グループでは、各形態種が自身を構成する株のほとんどを含んだが、*P. caudatum* の 6 株と *P. multimicronucleatum* の 1 株だけは *P. multimicronucleatum* に近接した別のグループを形成した。このグループは、鞠子ら (2014) が RAPD 系統樹で識別し、Group II-a と名付けたグループと全く同じ株構成であった。

Woodruff (1921) は、*Paramecium* 属を細胞の形態的特徴に基づいて *aurelia* グループ (*P. aurelia* complex、*P. caudatum*、*P. multimicronucleatum*、*P. jenningsi* など) と *bursaria* グループ (*P. bursaria*、*P. woodruffi*、*P. calkinsi* など) の二つに大別した。しかし、Riboprinting 系統樹においては、両グループは系統樹の基部では分岐せず、*P. aurelia* complex と *P. bursaria* は互いに最も近縁な形態種という位置づけになった。形態学を重視した古典的系統分類学と分子系統学が作成する系統樹は枝が重ならないケースが多々ある (Campbell *et al.*, 2011)。このケースもまたその一例と言えるが、近年の傾向としては分子系統学的な知見を重視する傾向があるので、本研究で作成された Riboprinting 系統樹は Woodruff の系統分類に対して再考を迫るものといえる。

Riboprinting 系統樹においては、一部の例外を除いて *P. caudatum* と *P. multimicronucleatum* の種内変異は検出されなかった。さらに *P. aurelia* complex の同胞種 4 株 (*P. tetraurelia*、*P. pentaurelia*、*P. octoauurelia*、*P. tredecaurelia*) と *P. jenningsi* ではバンドパターンにまったく差が無かった (表 2、図 1)。このため、鞠子ら (2014) による RAPD 系統樹で得られたような形態種の混在は検出できなかった。一方、変異が見られたのはいずれも RAPD 系統樹の Group II-a に属する株だった。

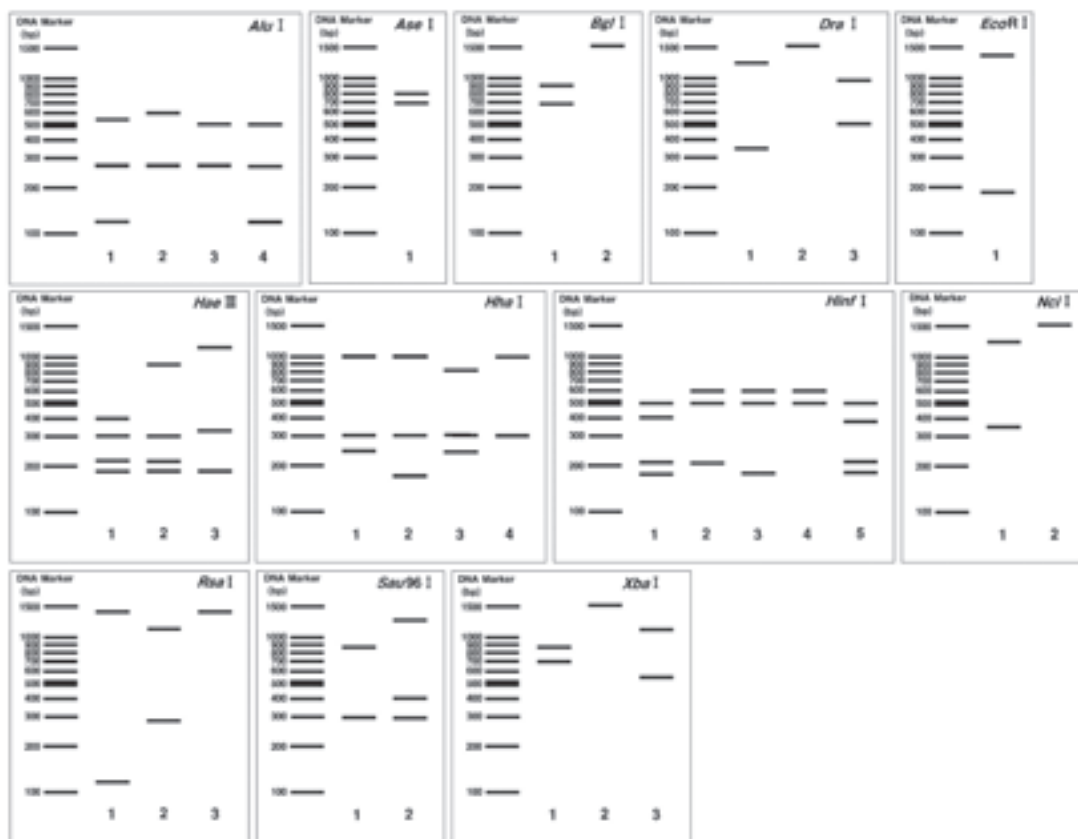


図1 Riboprinting による DNA バンドパターン

13 種類の制限酵素, *Alu* I, *Ase* I, *Bgl* I, *Dra* I, *EcoR* I, *Hae* III, *Hha* I, *Hinf* I, *Msp* I, *Nci* I, *Rsa* I, *Sau96* I, *Xho* I を用い, PCR で増幅した 18SrDNA 領域を切断した。但し, 100bp 以下のバンドは識別不能なため無視した。分子量マーカーには 100bp DNA Ladder (宝酒造) を用い, 各図左側に示す。

表2 調査株における制限酵素ごとの Riboprinting パターン^{注)}

Restriction enzyme	<i>Alu</i> I	<i>Ase</i> I	<i>Bgl</i> I	<i>Dra</i> I	<i>EcoR</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Nci</i> I	<i>Rsa</i> I	<i>Sau</i> 96 I	<i>Xho</i> I
Morphspecies (stock)													
<i>P. caudatum</i> , 35 stocks	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>P. caudatum</i>													
UC151	2	1	1	2	1	2	2	4	2	2	1	1	2
133-5	2	1	1	2	1	2	2	3	2	2	1	1	2
Jsh1-2	2	1	1	2	1	2	2	3	2	2	1	1	2
UC131	2	1	1	2	1	2	2	3	2	2	1	1	2
Hoa-1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2
Xam2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2
<i>P. multimicronucleatum</i> N93005	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2
<i>P. multimicronucleatum</i> , 9 stocks	2	1	1	2	1	2	1	1	2	2	2	1	2
<i>P. tetraurelia</i>	3	1	2	2	1	3	3	5	2	2	3	2	1
<i>P. aurelia</i>	3	1	2	2	1	3	3	5	2	2	3	2	1
complex	3	1	2	2	1	3	3	5	2	2	3	2	1
<i>P. octoauurelia</i>	3	1	2	2	1	3	3	5	2	2	3	2	1
<i>P. tredecaurelia</i>	3	1	2	2	1	3	3	5	2	2	3	2	1
<i>P. jenningsi</i>	3	1	2	2	1	3	3	5	2	2	3	2	1
<i>P. bursaria</i>	4	1	2	3	1	3	4	2	3	2	3	2	3

注) 表中の数字は図1のバンドパターンの番号を示す。

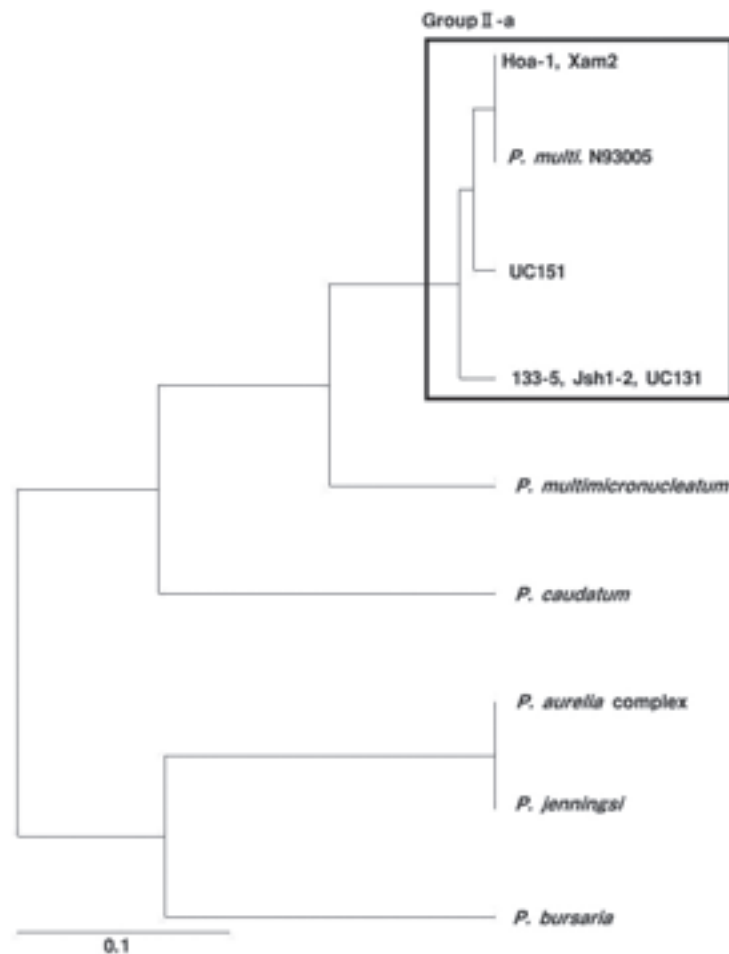


図2 Riboprinting による系統樹

P. caudatum 41 株, *P. multimicronucleatum* 10 株, *P. aurelia* complex (*P. tetraurelia*, *P. pentaurelia*, *P. octoaurelia*, *P. tredecaurelia* を各 1 株), *P. jenningsi*, *P. bursaria* を各 1 株について 13 種類の制限酵素, *Alu* I, *Ase* I, *Bgl* I, *Dra* I, *EcoR* I, *Hae* III, *Hha* I, *Hinf* I, *Msp* I, *Nci* I, *Rsa* I, *Sau96* I, *Xho* I によって, Riboprinting (18SrDNA の制限酵素断片多型調査) を行い, 検出バンドから UPGMA 法を用いて系統樹を作成した. 図中の Group II-a は RAPD の Group II-a を示す.

これらは Riboprinting 系統樹上でも同様に一つのグループを形成し, *P. multimicronucleatum* に近接していた (図 2)。このグループに属する株のうち, Hoa-1 と UC151 は *P. caudatum* の接合型 (O^1 または E^c) を持つが, これらの株の小核は vesicular タイプであり形態的には *P. multimicronucleatum* であると判定される。したがって, 得られた両系統樹からの知見と, Hoa-1 と UC151 が *P. caudatum* の接合型を持つ事実から, 接合型の収斂進化が形態種間でも起きていることが推察される。

最近の化石の研究 (Schönborn, 1999) からは, ゾウリムシは 2 億 3 千万年前にすでに存在していたという証拠が得られており, その起源は非常に古いと言える。とすれば, 長い歳月をかけて各系統が分岐を繰り返す過程で, 形態や接合型に収斂が起きた可能

性は十分考えられる。

IV まとめ

18S rDNA の制限酵素断片多型から系統関係を明らかにする Riboprinting 法を用いて, *Paramecium* 属の 5 つの形態種の系統関係を調べた。*Paramecium* 属の形態種は二つのグループに大別できた。Riboprinting では一部の例外を除いて形態種内の変異は検出されなかった。ただし, 鞠子ら (2014) が RAPD 系統樹から分離した Group II-a に属する株が Riboprinting による系統樹でも一つのグループを形成することが明らかとなった。このグループは全て *P. multimicronucleatum* の形態的特徴を有するが, 一部の株は *P. caudatum* の

接合型を持っていた。これにより、接合型の収斂進化が形態種間でも起きている可能性が示唆された。

引用文献

- Clark, C. G. and Diamond, L. S. (1991) The Laredo strain and other 'Entamoeba histolytica-like' amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 46(2): 11-18.
- Campbell, L. I., Rota-Stabelli, O., Edgecombe, G. D., Marchioro, T., Longhorn, S. T., Telford, M. J., Philippe, H., Rebecchi, L., Peterson, K. J. and Pisani, D. (2011) MicroRNAs and phylogenomics resolve the relationships of Tardigrada and suggest that velvet worms are the sister group of Arthropoda. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 15920-15924.
- Fokin, S. I. (1997) Morphological diversity of the micronuclei in *Paramecium*. *Archiv für Protistenkunde* 148: 375-387.
- 鞠子典子・月井雄二・鞠子茂・高橋三保子 (2014) *Paramecium* 野生株における分子系統樹の構築と形態学的特性. 法政大学多摩研究報告 29: 17-30.
- Schönborn, W., Dörfelt, H., Foissner, W., Krienitz, L. and Schäfer, U. (1999) A fossilized microcenosis in Triassic Amber. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46(6): 571-584.
- Sonneborn, T. M. (1937) Sex, sex inheritance and sex determination in *Paramecium aurelia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 23(7): 378-385.
- 高橋三保子 (2000) ゾウリムシの種進化の研究. 科学研究費補助金基盤研究 (B) 報告書. 55pp.
- Tsukii, Y. (1996) Genetic diversity among natural stocks of *Paramecium caudatum* revealed by RAPD markers. *European Journal of Protistology* 32: 165-169.
- Woodruff, L. L. (1921) The structure, life history and intragenetic relationships of *Paramecium calkinsi* n. sp. *The Biological Bulletin* 41: 171-180.

付録 Riboprinting により得られた株間の不一致率（遺伝的距離）

不一致率	Kum1-4	Kum1-5	Bz-1	UC032	UC031	UC162	UC153	Uv005	Uv001	Ugy481	Ugy494	Ugy545
Kum1-4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Kum1-5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Bz-1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UC032	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UC031	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UC162	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UC153	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Uv005	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Uv001	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ugy481	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ugy494	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ugy545	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ugy632	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ugy145	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Tan1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Tan2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UC081	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UC061	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UC011	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UC055	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UC113	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UC122	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UC094	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
UC096	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Uv051	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
GT806	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ghm-1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Uv013	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Uv024	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Uv064	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Uv073	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Uv035	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Uv074	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Uv083	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Uv084	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Hoa-1	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
133-5	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
N93005	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
Jsh1-2	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
Xam2	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
UC131	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
UC151	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
CH100	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
110B	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
Hawaii	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
CH313	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
B6	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
YM8	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
YM11	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
YM25	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
YM26	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
51	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
87	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
137	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
321	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
30997	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
Kz-1w	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55

Riboprinting により 2 つの株間で検出され DNA バンドの総数と共通する DNA バンドの総数を数え、両者のバンドの不一致率を算出した。

付録（続き）

[illegible]

[illegible]

付録（続き）

[illegible]

[illegible]